

文章编号:1000 - 0615(2002)03 - 0270 - 05

对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析

刘 萍, 孟宪红, 孔 杰, 李 健, 王伟继

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:对人工选育的第 3 代中国对虾和选育的第 1 代凡纳对虾进行个体人工感染 WSSV 后,选取感染 WSSV 十余天但仍健康的对虾为实验材料,用 220 个随机引物进行 RAPD 分析,得到抗病性状相关的特异性遗传标记 99 个。其中中国对虾抗病组特异性片段出现了 18 个,片段大小在 460~2305bp 之间;凡纳对虾抗病组特异性片段产生 81 个,片段大小在 435~2287bp。77 个引物在两种对虾的抗病组扩增出特异性遗传标记,其中有 4 个引物各获得了三个特异性片段,有 13 个引物各获得了两个特异性片段,其余 61 个引物各获得了 1 个特异性片段。

关键词:对虾;抗病性状;遗传标记;随机扩增多态 DNA

中图分类号:Q346+.5 **文献标识码:**A

RAPD analysis of genetic markers affiliated with disease resistant trait in shrimp

LIU Ping, MENG Xian-hong, KONG Jie, LI Jian, WANG Wei-ji

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The samples of *Penaeus chinensis* and *Penaeus vannamei* were the third and the first generation respectively by selective breeding which have been artificially infected with WSSV. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to analyze such samples that were still very healthy over ten days with 220 primers. 99 distinctive genetic markers affiliated with disease resistant trait were obtained, as analyzed, 18 were from *P. chinensis* disease resistant team with the molecular weight varying from 460 - 2305bp, and 81 were from *P. vannamei* disease resistant team with the molecular weight varying from 435 - 2287bp. Of 220 primers, 77 primers obtained distinctive genetic markers from the two teams, among which 3, 2 and 1 distinctive fragments could be obtained from 4, 13 and 61 primers, respectively.

Key words: shrimp; disease resistant trait; genetic marker; RAPD

在世界范围内已经陆续开展中国对虾 (*Penaeus chinensis*)、蓝对虾 (*P. stylirostris*)、日本对虾 (*P. japonicus*)、斑节对虾 (*P. monodon*) 和凡纳对虾 (*P. vannamei*) 等主要养殖种类的品种选育和健康养殖等研究工作^[1-3]。采用的技术主要以经典的选择育种技术和现代分子生物学技术的有机结合。法国海洋开发研究院 (IFREMER) 已经从蓝对虾种群中找到 10 个微卫星标记,从斑节对虾中找到 3 个微卫星标记,这些标记在识别混养的不同家系时发挥了作用。澳大利亚联邦科学和工业研究院 (CSIRO) 也

收稿日期:2002-01-21

资助项目:国家重点基础研究发展规划“973”项目(1999012007)和“863”项目“中国对虾的遗传改良及中试示范”(2001AA620105)

作者简介:刘 萍(1962-),女,辽宁兴城人,副研究员,硕士。主要从事海洋经济动物种质资源与遗传育种研究。E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

已经成功地从日本对虾中找到 3 个可能与生长表现相关的基因位点,并有可能进一步开发为可预测生长的基因标记。美国在凡纳对虾高健康和无特异病原虾品系的培育中运用 RAPD 技术,对各品系的群体遗传变异水平进行了检测,并成功地筛选出一些特异性标记^[4-5]。中国对虾是我国的主要海产捕捞对象和水产养殖的重要虾类之一,但近十年来出现的病害肆虐、规格下降等问题已严重制约着养殖业的发展。遗传标记技术的研究目前起步较晚,且大部为种群遗传多样性的研究^[6-8]。关于对虾群体特异性遗传标记的报道较少,针对对虾经济性状相关的遗传标记的研究尚未见报道。因此,我们采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术与传统的性状选择育种有机结合,尝试与经济性状相关的数量性状与 DNA 分子遗传标记建立连锁关系,为进一步将与经济性状有关的基因进行定位、克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料选用中国对虾和凡纳对虾。中国对虾为人工选育抗病第 3 代对虾,共 20 尾,进行人工感染 WSSV 后 10 余天后,仍然健康的个体为试验组;对照组为人工感染 WSSV 后濒于死亡或死亡的个体。凡纳对虾为人工选育抗病第 1 代对虾,进行人工感染 WSSV 后 10 余天后,仍然健康的个体;对照组为人工感染 WSSV 后濒于死亡或死亡的个体。人工感染采用个体定量投喂方式,毒饵制备采用病虾头去壳后匀浆,与一些配合饲料混匀挤压而成。本试验中选用的个体均经病毒 PCR 检测的阳性个体,每个组均选择 8 个个体。

1.2 方法

1.2.1 样品基因组 DNA 提取及定量方法

每个个体 DNA 提取和定量方法的主要过程参照刘萍等^[8],用灭菌水稀释成 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,将每个试验组和对照组个体进行等量混合,制备成 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合模板 DNA。

1.2.2 RAPD 反应

RAPD 反应总体积为 $25\mu\text{L}$,其中包括 $10\times\text{PCR}$ 反应缓冲液 $2.5\mu\text{L}$ (成分: $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl, $500\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ KCl, $15\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.01% Gelatin, pH 8.4);基因组 DNA ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $2\mu\text{L}$; Tag 酶 ($5\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\mu\text{L}$; dNTP (各 $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\mu\text{L}$;引物 ($5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\mu\text{L}$;用 ddH₂O 补足体积。样品在 PE-9600 扩增仪上进行扩增,94 变性 5min;94 1min,36 1min,72 2min,45 个循环;72 延伸 10min;4 保存。

1.2.3 RAPD 产物的分离鉴定

取扩增产物 $5\mu\text{L}$ 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,在 Gel Doc 1000 凝胶成像仪进行分析照像,找出抗病群体比其对照组群体的样品中多出的 DNA 片段(抗病群体的每个样品不出现个体差异),并计算特异性片段大小。

2 结果

本试验共筛选 S101~300 和 OPE01~20 共计 220 个随机引物,得到与抗病性状相关的特异性遗传标记 98 个,表 1 中列举部分。其中中国对虾抗病群体特异性片段出现 18 个,片段大小在 $460\sim 2305\text{bp}$ 之间;凡纳对虾抗病群体特异性片段产生 81 个,片段大小在 $435\sim 2287\text{bp}$ 。如图 1 中第 11 泳道 702bp 处、第 15 泳道 1492 和 672bp 处和第 19 泳道 701bp 处。

实验中使用的 220 个随机引物,其中 77 个引物在两种对虾的抗病群体中扩增出特异性遗传标记。S-175、S-216、S-259 和 S-272 4 个引物均获得了 3 个特异性片段;S-108、S-124、S-125、S-171、S-224、S-226、

孔 杰. 中国对虾不同群体的遗传差异与抗病群体选育的研究[D]. 中国水产科学研究院黄海水产研究所博士论文. 2001, 66.

S-232、S-257、S-262、S-271、S-276、S-280 和 OPE-10 等 13 个引物获得了两个特异性片段,其余 61 个引物均获得了 1 个特异性片段。

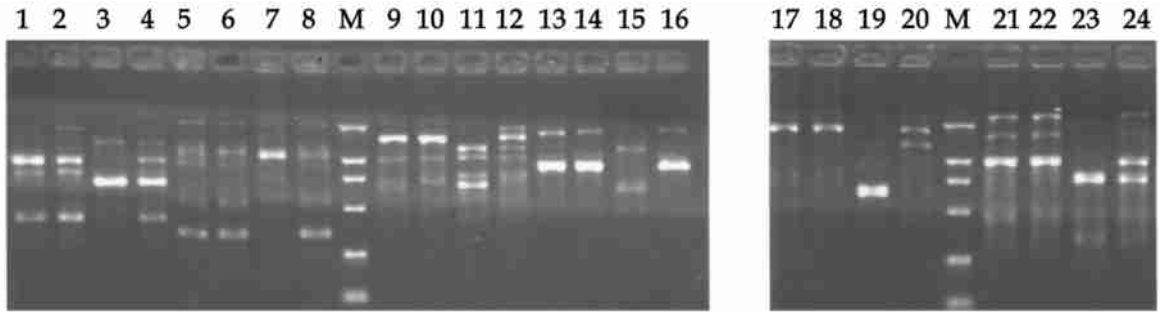


图 1 两种对虾的 RAPD 扩增结果

Fig. 1 RAPD result of the two kinds of shrimps

1、5、9、13、17、21:中国对虾试验组;2、6、10、14、18、22:中国对虾对照组;
3、7、11、15、19、23:凡纳对虾试验组;4、8、12、16、20、24:凡纳对虾对照组.

1,5,9,13,17,21:experimental group of *P. chinensis*; 3,7,11,15,19,23:experimental group of *P. chinensis*;
3,7,11,15,19,23:experimental group of *P. vannamei*; 4,8,12,16,20,24:comparison team of *P. vannamei*.

M:2000,1000,750,500,250,100bp

表 1 RAPD 技术对对虾抗病群体遗传标记的筛选

Tab.1 Screen result of shrimps genetic markers affiliated with disease resistant trait by RAPD technique

序号 No.	引物序列 5' to 3' primer sequence	长度 (bp) size	种类 species	序号 No.	引物序列 5' to 3' primer sequence	长度 (bp) size	种类 species
1	TCGGACGTGA	707	凡纳对虾	40	CTCCCTGCAA	925	中国对虾
2	GGAAGTCGCC	1720	凡纳对虾	41	CCCCTCACGA	920	中国对虾
3	AGTCGTCCCC	922	凡纳对虾	42	CCCCTCACGA	721	凡纳对虾
4	GAAACACCCC	985	中国对虾	43	ACGCCCAGGT	656	凡纳对虾
5	GAAACACCCC	1655	中国对虾	44	ACGCCCAGGT	685	中国对虾
6	GAATCGGCCA	771	中国对虾	45	ACGCCCAGGT	1656	凡纳对虾
7	GGTATCAGG	1582	中国对虾	46	ACGCCCAGGT	1721	凡纳对虾
8	CCGAATCC	460	中国对虾	47	ACGCCCAGGT	839	凡纳对虾
9	CCGAATCC	760	中国对虾	48	ACGCCCAGGT	938	凡纳对虾
10	CCGATATCC	1083	中国对虾	49	ACGCCCAGGT	553	凡纳对虾
11	GGGATATCGG	975	中国对虾	50	ACGCCCAGGT	743	凡纳对虾
12	GGAAGCTTGG	660	中国对虾	51	ACGCCCAGGT	1502	凡纳对虾
13	ACGGTACCAG	515	中国对虾	52	ACGCCCAGGT	718	凡纳对虾
14	GGCTGCAGAA	435	中国对虾	53	ACGCCCAGGT	1661	中国对虾
15	CCAGTACTCC	978	中国对虾	54	ACGCCCAGGT	481	凡纳对虾
16	CCTCTAGACC	556	中国对虾	55	ACGCCCAGGT	570	凡纳对虾
17	TCAGGGAGGT	509	中国对虾	56	ACGCCCAGGT	1630	凡纳对虾
18	AAGACCCCTC	2000	中国对虾	57	ACGCCCAGGT	2270	凡纳对虾
19	AGATGCAGCC	1047	中国对虾	58	ACGCCCAGGT	1568	凡纳对虾
20	TCACCACGGT	1017	中国对虾	59	ACGCCCAGGT	706	凡纳对虾
21	CTACTGCCGT	1158	中国对虾	60	ACGCCCAGGT	2305	中国对虾
22	GGACTGCAGA	1165	中国对虾	61	ACGCCCAGGT	1865	凡纳对虾
23	ACCTGGACAC	2000	中国对虾	62	ACGCCCAGGT	798	凡纳对虾
24	AAGGCGGCAG	765	中国对虾	63	ACGCCCAGGT	977	凡纳对虾
25	TTTGCCCGGT	672	中国对虾	64	ACGCCCAGGT	745	凡纳对虾
26	ACATGCCGAT	2000	中国对虾	65	ACGCCCAGGT	1000	凡纳对虾
27	TCA TCCGAGG	1022	中国对虾	66	ACGCCCAGGT	1039	中国对虾
28	TCTCCGCCCT	447	中国对虾	67	ACGCCCAGGT	652	凡纳对虾

续表 1

序号 No.	引物序列 5' to 3' primer sequence	长度(bp) size	种类 species	序号 No.	引物序列 5' to 3' primer sequence	长度(bp) size	种类 species
29	AATGCGGGAG	1504	中国对虾	68	ACGCCCAGGT	1910	凡纳对虾
30	CAGAGGTCCC	1225	中国对虾	69	ACGCCCAGGT	1640	凡纳对虾
31	TTTGGGGCCT	778	中国对虾	70	ACGCCCAGGT	1505	凡纳对虾
32	TCCGATGCTG	943	中国对虾	71	ACGCCCAGGT	702	凡纳对虾
33	ACCGTTCCAG	1622	中国对虾	72	ACGCCCAGGT	1492	凡纳对虾
34	CTGGGTGAGT	1611	中国对虾	73	ACGCCCAGGT	672	凡纳对虾
35	TCCACTCCTG	1000	中国对虾	74	ACGCCCAGGT	2215	凡纳对虾
36	GGCAGGCTGT	1568	中国对虾	75	ACGCCCAGGT	957	中国对虾
37	AACGGCGACA	497	中国对虾	76	ACGCCCAGGT	725	凡纳对虾
38	AGGACTGCCA	1058	中国对虾	77	ACGCCCAGGT	701	凡纳对虾
39	GGTGAACGCT	1843	中国对虾	78	ACGCCCAGGT	1927	凡纳对虾

3 讨论

RAPD 技术是一种研究基因组遗传标记的方法,具有相对简便、易于操作,省时省力,无需专门设计引物,产物遗传多样性丰富等优点。模板 DNA 经 94 °C 变性解链后,在较低的温度下(低于 40 °C)退火,这时形成的单链模板会有许多位点与引物互补配对形成双链结构,完成 DNA 合成,即产生片段大小不等(200 ~ 4 000bp)的扩增产物。扩增产物片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性,据此可以根据扩增谱带的差异而将同一物种的不同性状区分开来。本试验中使用 220 个随机引物,77 个引物两种对虾的抗病群体扩增出特异性遗传标记,不同的引物所获得的特异性遗传标记数不同,仅仅 4 个引物均获得了三个特异性片段,13 个引物获得了两个特异性片段,其余 61 个引物均获得了 1 个特异性片段。其次,本试验所得到的可能与抗病性状相关的特异性遗传标记 98 个,其中中国对虾抗病群体特异性片段出现了 17 个(片段大小在 460 ~ 2 305bp);凡纳对虾抗病群体特异性片段产生 81 个(片段大小在 435 ~ 2 287bp)。造成两种对虾抗病群体特异性片段数目上产生较大差异的原因,主要是:(1)中国对虾野生群体本身遗传多样性低于凡纳对虾野生群体^[9-10],中国对虾朝鲜西海岸群体的多态位点为 39%,黄渤海群体的遗传多样性更低,多态位点为 36.8%,而凡纳对虾的多态位点高达 39%~77%。因而,凡纳对虾群体间的遗传标记容易筛选,虽然中国对虾经过了第 3 代人工选育,而凡纳对虾仅仅进行了第 1 代选育,但这些并不足以影响其本身的遗传多样性;(2)凡纳对虾抗病组的特异性片段部分是和对虾抗病性状相关的遗传标记,而部分为显示群体间的遗传标记。因而若想得到与对虾抗病性状紧密相关的特异性片段,尚需进行克隆、测序筛选,进一步的研究工作正在进行中。

我们经过近年来的人工选育,现在已经选育出生长速度快的第五代群体和抗 WSSV 病毒病的第 4 代群体,这些人工选育的对虾已显示出良好的生长特征和抗逆性。并应用现代分子生物学技术,快速确定优良性状的分子标记,结合遗传学原理,可缩短良种选育周期,在短期内培育出优良品种。筛选生长速度快和抗病力强的对虾品系,是实现集约化养殖的根本基础,也是人们不懈追求的目标。筛选与保存高产、优质、抗逆的种质,是把我国对虾养殖业推向新的台阶必不可少的环节。

参考文献:

- [1] Pruder G D, Brown C L, Sweeney J N, et al. High health shrimp systems: seed supply theory and practice [A]. In: Browdy C L, Hopkins J S (Editors), Swimming through troubled waters, Proceedings of the special session on shrimp farming [C]. 1 - 4 February, San Diego, C A. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 1995. 40 - 52.
- [2] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei* [J]. World Aquac, 1995, 24: 39 - 45.
- [3] Carr W, Sweeney J, Swingle J. The Oceanic Institute's SPF shrimp breeding program status [A]. USMSFP (US Marine Shrimp Farming) 10th Anniversary Review [C]. GCRL Special Publication, 1994. (1): 47 - 54.
- [4] Garcia D K, Dhar A K, Alcivar-Warren A. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveal two microsatellites and differential mRNA

- expression in *Penaeus vannamei*[J]. Mol Mar Biol Biotech. 1996, 5(1) : 71 - 83
- [5] Alcivar-Warren A, Overstreet R M, Dhar A K. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei* : Possible relationship with growth and metabolic gene expression[J]. J Invertebr Pathol, 1997, 70(3) : 190 - 197.
- [6] Song L S, Xiang J H, Li C X, et al. Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3) : 261 - 265. [宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3) : 261 - 265.]
- [7] Shi T, Kong J, Liu P, et al. Genetic diversity analysis on *Penaeus chinensis* by RAPD —— the DNA polymorphism of western coastal population of Korean peninsular[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(6) : 609 - 615. [石拓, 孔杰, 刘萍, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析—朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6) : 609 - 615.]
- [8] Liu P, Kong J, Shi T, et al. RAPD analysis of the wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the Chinese coastal waters of Yellow Sea and the coastal waters of Bohai Seas[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2000, 7(2) : 86 - 89.
- [9] Garcia D K, Benzie J A H. The use of RAPD markers on penaeus prawn breeding program[J]. Aquac, 1994, 130:137 - 144.
- [10] Garcia D K, Faggart M A, Rhodes L, et al. Genetics diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. Mol Mar Biol Biotech, 1994, 3:270 - 280.

书讯：

《中国水产标准汇编》出版发行

为满足渔业生产、管理和开发水产品贸易活动的需要,农业部渔业局、全国水产标准化技术委员会和渔船标准化技术委员会将近年来(截止到 2001 年底)陆续发布的水产国家标准、行业标准汇编成册,现已出版发行。该标准可供广大渔民及与渔业有关的生产、经营、管理、质量检验、科研、教学单位使用和参考。

“水产养殖与水产品加工卷”共汇集了 37 项标准。本卷主要内容有养殖鱼类种质、亲本、苗种标准,养殖技术规范,饲料,鲜、冻水产品,水产加工品标准,水产品检测方法标准按危害分析与关键控制点(HACCP)原则制定的水产品质量管理规范等。

“船网机具卷”共汇集了 72 项标准,本卷主要内容有渔业机械术语标准,渔具制作标准,渔业机械、渔业仪器产品标准,渔业机械检验标准,渔船设备及安装标准,玻璃钢渔船制作标准和渔船修理标准等。

《中国水产标准汇编》(水产养殖与水产品加工卷·船网机具卷)每套 120 元(含邮费)。请需要标准的单位或个人汇款至:北京市丰台区青塔村 150 号,邮编:100039,中国水产科学研究院质量标准办公室。也可通过银行汇款:北京工商银行永定路分理处,户名:中国水产科学研究院,帐号:14442828(请注明:标准汇编)。联系电话:010-68673936,联系人:刘琪。